

МУФЕР КОНСОЛАР

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И ЭЛИМИНАЦИИ
HELICOBACTER PYLORI ПРИ ЯЗВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА**

03.00.07 – микробиология

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань - 2007

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанской государственной медицинской академии МЗ СР РФ

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Поздеев Оскар Кимович
доктор биологических наук, профессор
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Госманов Рауис Госманович (зав. каф.
микробиологии, вирусологии и
иммунологии КГВМА, г. Казань)

доктор биологических наук, профессор
Чернов Владислав Моисеевич (зам.
директора Казанского института
биохимии и биофизики РАН, г. Казань)

Ведущая организация: ФГУП Казанский научно-исследовательский
институт эпидемиологии микробиологии,
г. Казань

Защита диссертации состоится «22» марта 2007 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан февраля 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

З.И.Абрамова

Актуальность: Заболевания, обусловленные *Helicobacter pylori*, составляют важную медико-социальную проблему современной медицины (Григорьев, 1986). *H. pylori* является широко распространённой бактерией, и по разным данным, инфицированность населения варьирует в пределах 60-90% (Cave, 1997). Бактерии выявляют у 80-100% больных хроническим гастритом, у 70-80% страдающих язвой желудка, у 90-100% — язвой двенадцатиперстной кишки, а также у 100% пациентов с MALT-лимфомами, у 80-95% с аденокарциномами желудка и у 60% больных с диспепсиями неязвенной этиологии (Moran et al., 1996). Кроме того, ряд авторов предполагает наличие взаимосвязи между инфицированием *H. pylori* и развитием ишемической болезни сердца (Mendall et al., 1994; Sandifer et al., 1996; Roussos et al., 2003).

Известно, что инфицированность *H. pylori* в четыре раза повышает риск развития язвенной патологии желудочно-кишечного тракта (Forman, 1991, 1996). При этом колонизация бактериями слизистой желудка не всегда вызывает развернутую картину хронического гастрита. Чаще можно наблюдать латентный процесс либо бессимптомное носительство (Haas et al., 1994).

До настоящего времени эффективность рекомендованных схем лечения хеликобактериозов варьирует в пределах 65-87%, но в большинстве случаев она зависит от чувствительности бактерий к применяемым антибактериальным препаратам (Brzozowski et al., 2003; Graham et al., 1996). В Европе резистентность *H. pylori* к метронидазолу, в среднем, составляет 27% и к кларитромицину 10% (Glupczynski et al., 2001). В США устойчивость к метронидазолу и кларитромицину составляет 25,1% и 12,9% (Duck et al., 2004), а в странах Латинской Америки до 80% штаммов бактерий нечувствительны к метронидазолу (Magalhaes et al., 2002). В странах Азии резистентность хеликобактеров к метронидазолу увеличилось с 22% в 1991 году до 73% в 1995 году (Ling et al., 1996). Также отмечен стремительный рост резистентности *H. pylori* к тетрациклину (Ribiero et al., 2004) и по

данным Jeng Yih Wu, (2005г) резистентность *H. pylori* к тетрациклину достигает 59% в Китае.

В РФ резистентность бактерий к метронидазолу у больных, ранее получавших антихеликобактерную терапию по поводу язвенной болезни, может достигать 100% (Кудрявцева, 1999). Резистентные штаммы *H. pylori* значительно труднее поддаются элиминации, что существенно снижает (до 50%) эффективность проводимого лечения и делает его экономически невыгодными (Иваницкий, 1998; Мерабишвили, 2001; Иваников, 2002). С повышением резистентности бактерий связывают рост осложнений гастродуоденальной патологии, и, следовательно, значительное увеличение затрат на лечение, что является не только медицинской, но и социально-экономической проблемой.

При лечении различных гастродуоденальных патологий широко применяют минерализованные воды и озонированные растворы. Л.В. Игнатко и В.В. Швардака (2001) установили, что сульфидная слабоминерализованная вода в дозе 5мл/кг массы тела в комплексной терапии приводит к эрадикации *H. pylori* у детей. Еще в 1994 году, Nawrylik и соавторы сообщили об ингибирующем действием бисульфитных и сульфитных катионов на рост *H.pylori* in vitro. По данным В.А. Максимова и соавт. (1994), озон воздействует на различные звенья патогенеза язвенной болезни; а внутривенное введение озонированного физиологического раствора приводит к эрадикации *H. pylori* в 40-60% случаев (Каратаев и соавт., 2001).

Вышеуказанное делает перспективным поиск и внедрение в практику новых доступных подходов к элиминации *H. pylori*, направленных на улучшение результатов лечения язвенной гастродуоденальной патологии.

Известно, что «золотым стандартом» бактериологической диагностики хеликобактериозов является выделение возбудителя из биоптатов слизистой (Баженов и соавт., 1990; Аруин, 1993). При этом важным этапом

проводимого анализа является выявление уреазы. К настоящему времени предложено множество методик регистрации активности фермента без выделения бактерий, а полученные результаты трактуют как косвенно свидетельствующие о наличии *H.pylori*. Тем не менее, все они не свободны от ложноположительных результатов, т.к. на момент исследования в желудке и двенадцатиперстной кишке может присутствовать сопутствующая микрофлора, многие представители способны синтезировать уреазу. Следует отметить, что с аналогичными контаминантами можно столкнуться и при проведении посевов. Этот факт представляется существенно значимым для разработки новых селективных сред и более устойчивых уреазных тестов.

Целью данной работы явилась разработка новых подходов к идентификации и элиминации *H. pylori* у пациентов с язвенными поражениями желудка и двенадцатиперстной кишки.

Основные задачи исследования:

1. Изучить влияние озонированной и сульфидной минерализованной воды на культуральные и биохимические свойства *H. pylori* in vitro.
2. Разработать новую питательную среду и модифицировать уреазный тест для ускоренного выделения *H. pylori*.
3. Определить частоту обнаружения *H. pylori* у пациентов с раком желудка, гастродуоденитами и соответствующими язвенными поражениями в зависимости от пола и возраста больных и установить корреляцию между ней и заболеваемостью гастродуоденального отдела желудочно-кишечного тракта.
4. Определить вирулентные свойства и чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов *H. pylori*, выделенных от больных язвенной патологией желудка и двенадцатиперстной кишки.
5. Определить частоту повторного обнаружения *H. pylori* у прооперированных больных, получавших курсы премедикации и послеоперационной антибактериальной терапии и оценить их эффективность.

6. Изучить возможность длительного сохранения культур *H. pylori*.

Научная новизна

Впервые установлено, что озонированная вода концентрация озона 5мкг/мл снижает жизнеспособность *H. pylori* in vitro, в том числе за счет ограничения их подвижности, снижения уреазной активности и подавления роста на плотных средах. Сульфидная минерализованная вода из источника санатория «Чувашия» в различных концентрациях проявляет аналогичные свойства в отношении культур *H. pylori* in vitro.

Выявлена корреляция между степенью вирулентности изолятов *H. pylori* и тяжестью последовательных патологий слизистой желудка.

Впервые разработан и использован на практике эритрит-сывороточный агар с мочевиной (ЭСАМ) для ускоренной идентификации *H. pylori* из клинического материала.

Впервые разработан модифицированный уреазный тест, включающий применение 1% раствора Люголя и фурацилина, для определения уреазной активности *H. pylori* в биоптатах.

Предложена методика длительного сохранения выделенных штаммов *H. pylori* в консервирующей смеси при –10 °С.

Практическая значимость

Новые методы выделения и идентификации *H. pylori*, предложенные в работе, значительно облегчают культивирование и идентификацию бактерий, выделенных из клинического материала. Разработанная модификация уреазного теста отличается простотой проведения, доступностью и воспроизводимостью полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Озонированная вода в концентрации 5мкг/мл и сульфидная минерализованная вода из источника санатория «Чувашия» в различных концентрациях снижают жизнеспособность *H. pylori* in vitro, проявляющуюся ограничением их подвижности, угнетением синтеза уреазы и подавлением роста на плотных средах.

2. Степень тяжести последовательных патологий желудочно-кишечного тракта зависит от степени вирулентности *H. pylori*.
3. Возможно длительное хранение изолятов *H. pylori* при -10°C в консервирующей смеси (сахарозо-желатиновой среде в буферном растворе) на срок до 12 месяцев.
4. Для ускоренной идентификации *H. pylori* из клинического материала можно использовать эритрит-сывороточный агар с мочевиной (ЭСАМ) и модифицированный уреазный тест, включающий применение 1% раствора Люголя и фурацилина.

Апробация материалов работы

Основные положения диссертации доложены на 11-ой научно-практической конференции Поволжского региона «Окружающая среда и здоровье населения» (Казань 2004); на 13-ой научно-практической конференции Поволжского региона «Окружающая среда и здоровье населения» (Казань 2005); на международном симпозиуме «Научные основы обеспечения защиты животных от экзотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» (Казань 2005), на научно-практическом семинаре «Современные возможности выявления *H. pylori* и кампилобактерий в лабораторной практике» (Казань 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, получен патент на изобретения метода выделения *H. pylori*, 2 приоритетные справки на изобретение метода эрадикации *H. pylori* и питательной среды для ускоренной идентификации *H. pylori*.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела результатов исследований, обсуждения результатов, выводов, приложения к работе и списка литературы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, включает 10 таблиц, 13 рисунков. Библиография содержит 305 наименований российских и зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материал: Нами обследовано **304** больных в возрасте от **19** до **84** лет, обращавшихся в три больницы г. Казани республики Татарстан с целью эндоскопического исследования верхних отделов желудочно-кишечного тракта. Среди них мужчин –197 (64,8%), женщин –107 (35,2%). Материалом для исследования служили биоптаты, полученные при ФЭГДС больных.

Тест-штаммы: *Escherichia coli* 657, *Proteus vulgaris* 019, *Pseudomonas aeruginosa*.

Питательные среды и реагенты:

Транспортная полужидкая тиогликолевая среда: питательный бульон 1л, 0,1% агара, 0,5% глюкозы, 0,1% натрия тиогликолата.

КА: агар с экстрактом сердечной мышцы (HIA) (Difco) 40г, ДН₂О 1л, 12,5 мл дефибринированной крови кролика.

КАА: агар с экстрактом сердечной мышцы (HIA) (Difco) 40г, ДН₂О 1л, 12,5 мл дефибринированной крови кролика, 3мг Амфотерицин В.

ЭКАА: эритрит агар 36г, ДН₂О 1л, 12,5 мл дефибринированной крови кролика, 3мг Амфотерицин В.

Сю–тест: мочевины 10 мг, тетрациклин 10ЕД, феноловый красный 8-10 кристаллов.

Антибактериальные препараты: стандартные диски: Амоксицилин-20мкг; Кларитромицин -15мкг; Ципрофлоксацин -5мкг; Тетрациклин -30мкг; Эритромицин- 15мкг; Цефазолин -30мкг; Цефалотин -30мкг; Цефалексин-30мкг; Фуразидол -30мкг; Метронидазол -30мкг.

Культивирование и выделение *H. pylori*

Для обнаружения *H. pylori* использовали комплексный метод, включающий микроскопию мазков отпечатков, окрашенных по Граму и фуксином, изучения «винтообразной подвижности» в препарате «раздавленная капля» методом фазово-контрастной микроскопии, постановку уреазного теста и бактериологическое выделение, и идентификацию культур *H. pylori* с определением степени обсемененности

биоптата.

Вирулентность выделенных штаммов определяли по способности воспринимать краситель Романовского-Гимзы по методике, предложенной Л.В. Григорьевой и соавт. (1992) для сальмонелл и эшерихий. Для изучения адгезивных свойств выделенных штаммов *H. pylori* применяли реакцию прямой гемагглютинации на стекле в присутствии D-маннозы по методу, предложенному Б.Г. Каральником и соавт. (1990) для *Citrobacter*.

Для определения антибиотикограмм штаммов *H. pylori*, выделенных у обследованных лиц, мы использовали диско-диффузионный метод со стандартными дисками антибиотиков и производных имидазола (метронидазол и фуразолидол).

Нами была изучена способность *H. pylori* (30 изолятов) к длительному сохранению при -10°C в морозильной камере в модифицированной консервирующей смеси (сахарозо-желатиновая среда в буферно – физиологическом растворе). Через 6-9-12-15-18 месяцев производили медленное размораживание культур при комнатной температуре с последующим высевом на эритроцит-агар и кровяной агар (содержащий 10% бараньей крови), дополненные внесением 3 мг амфотерицина В.

Изучение влияния минерализованной сульфидной воды из санатория «Чувашия» и озонированной воды на культуральные и биохимические свойства *H. pylori*

Мы исследовали влияние минерализованной сульфидной воды из санатория «Чувашия» и озонированной воды (концентрация озона 5микрограмм/мл) на жизнеспособность *H. pylori*. По химическому составу воду из скважины санатория «Чувашия» относят к высокоминерализованным водам. Для доказательства безопасности приема изучаемой воды исследованы некоторые параметры биохимических синдромов, обусловленных функциональным состоянием печени, в частности показатели синдрома цитолиза гепатоцитов: уровни аланин и аспарагин аминотрансфераз, а также билирубина в крови. Биохимические показатели

изучены у волонтеров, принимавших минеральную воду с содержанием сероводорода от 12,5 до 25 мг/л до 300 мл в сутки. До начала приема изучаемые параметры не отличались от нормы. После окончания курса отмечена тенденция к снижению уровню билирубина и аминотрансфераз, что свидетельствует об отсутствии гепатотоксического действия и адекватности применяемых нами количеств воды. Также установлено, что данная вода соответствует нормативам по микробиологическим показателям (ГОСТ 2761-84).

Для изучения влияния минерализованной сульфидной воды из санатория «Чувашия» и озонированной воды на *H. pylori* были обследованы биоптаты, полученные от 22 пациентов. Биоптаты гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках в 2 мл физиологического раствора.

В мазках из полученной взвеси определили подвижность *H. pylori* методом фазово-контрастной микроскопии, используя в опытных вариантах минерализованную сульфидную либо озонированную воду. Контролем служили взвеси бактерий в физиологическом растворе. Определяли уреазную активность в Clo-тесте после инкубирования взвеси микробов 5, 10 и 20 минут в пробирке с 1мл озонированной воды

Затем по 0,5 мл взвеси вносили в пробирки с 1мл минерализованной сульфидной воды (с концентрации H_2S 25, 10 и 2,5 мг/л) и озонированной водой. Спустя 30 и 60 минут проводили высевы бактериальной взвеси петлей (0,004 мл эмульсии) на чашки с кровяным агаром. Посевы культивировали в течение 3-5 суток в микроаэрофильных условиях при температуре 37°C и влажности 98%, как указано выше. После культивирования определяли принадлежность культур к *H. pylori*.

Разработка новой питательной среды для ускоренной идентификации *H. pylori*.

Для выделения *H.pylori* из водных источников А.Л. Дегнан с коллегами (2003) предложили специальную среду, содержащую необходимые ростовые факторы. Ее недостатком является содержание большого набора

антибиотиков (полимиксин В, амфотерицин В, ванкомицин, триметоприм и цефсулодин), что сказывается на стоимости. Мы предложили модифицированную среду ЭСАМ (эритрит сывороточный агар с мочевиной) для выделения хеликобактеров из патологического материала больных. В ее составе были оставлены лишь амфотерицин В и ванкомицин, эритрит агар заменили на обычный агар.

Готовую среду разливали в чашки Петри, куда вносили по 1 капле бактериальной суспензии. В качестве контроля, использовали суточные культуры *P. vulgaris* 019 (уреаза-положительный контроль) и *E.coli* 657 (отрицательный контроль). Культивирование тест-культур проводили в аэробных условиях при температуре 37 °С в течении 24 часов.

Модификация экспресс-теста для определения уреазной активности *H. pylori*

В 1989 году Б.Д. Старостин и А. В. Петрутик предложили экспресс-метод диагностики инфицированности *H. pylori* слизистой оболочки желудка, и предложили уреазный тест с использованием мочевины, тетрациклина и индикатора фенолового красного.

Нами разработана модификация этого метода, заменив тетрациклин на фурацилин, раствор Люголя и хлорамин. Состав тест-систем представлен в таблице 1.

Мы применяли данные тест-системы для определения уреазной активности *H.pylori* в биоптатах. В качестве контроля, мы использовали суточные культуры *P. vulgaris* 019 (положительный контроль) и *E.coli* 657 (отрицательный контроль). Биоптаты и культуры вносили в пробирки, содержащие по 1мл исследуемого раствора для определения уреазной активности. Пробирки инкубировали 24 часа при 37 °С. После инкубирования учитывали результаты по изменению окраски фенолового красного от исходного до малинового.

Таблица 1.

Состав тестов для определения уреазной активности *H.pylori*

№ теста	Мочевина	Дист. Вода	Фенол рот	фурацилин	1% раствор ПК	10% раствор ПК	1% раствор хлорамин
1	100мг	40мл	2 капли	10мг	—	—	—
2	100мг	40мл	2 капли	—	1мл	—	—
3	100мг	40мл	2 капли	—	—	1мл	—
4	100мг	40мл	2 капли	—	—	—	1мл

Статистическая обработка: Для вычисления средних величин, средней квадратичной ошибки, критерия достоверности разности средних величин использовали программный пакет Microsoft Office 2000 и Statistica 6.0 for Windows.

Результаты и их обсуждения

По данным П.А. Щербакова (1991) и R. Sitas et al. (1991), *H. pylori* выделяют с одинаковой частотой у мужчин и женщин, и частота инфицированности микроорганизмом увеличивается с возрастом. Единичные бактерии могут быть обнаружены на слизистой оболочки желудка у двухмесячных детей, а в возрасте 9 месяцев можно обнаружить случаи выраженной инвазии хеликобактерами. Среди 5-6-летних детей инфицированность составляет, в среднем, 40-45%, а к 14-15 годам она достигает уровней, характерных для взрослых (65-70%) (Patel et al., 1994). По нашим данным, частота выделения *H. pylori* у лиц мужского пола и женского пола не имеет существенных отличий ($68,02 \pm 4,02\%$ и $67,28 \pm 5,52\%$ соответственно) (см. рис.1.). Бактерии чаще всего обнаруживали у лиц от 65 лет и старше — $79,42 \pm 4\%$. У лиц от 45 до 64 лет в $68,46 \pm 4,07\%$ случаев, от 25 до 44 лет в $56,82 \pm 7,5\%$ случаев и у лиц до 24 лет только в $39,29 \pm 9,2\%$ случаев.

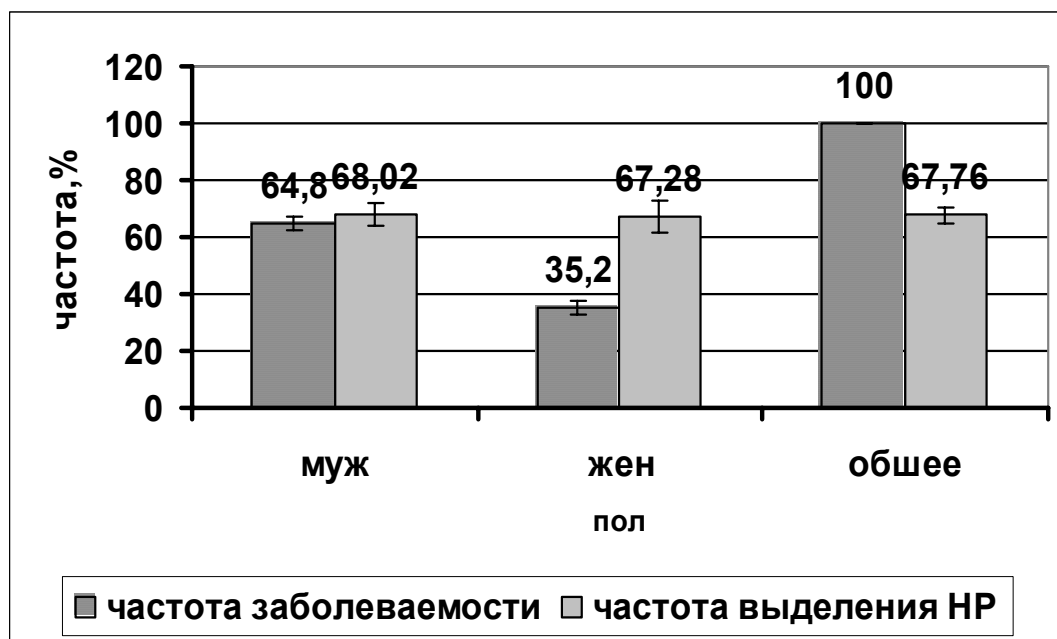


Рисунок 1. Частота выделения *H. pylori* в зависимости от пола пациентов

Бактерии выявляют у 80-100% больных хроническим гастритом, у 70-80% страдающих язвой желудка, у 90-100% — язвой двенадцатиперстной кишки, а также у 100% пациентов с MALT-лимфомами (Alkan et al., 1996; Sipponen, 1992; Sipponen et al., 1999), у 80-95% с аденокарциномами желудка и у 60% больных с диспепсиями неязвенной этиологии (Moran et al., 1996).

Мы установили, что у больных раком желудка частота выделения *H. pylori* составляет, в среднем, $79,59 \pm 5,75\%$; у больных с язвенной болезнью желудка — $81,25 \pm 6,89\%$ и с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки — $82,35 \pm 5,36\%$. У пациентов с гастритами частота выделения *H. pylori* составляла, в среднем, $60,74 \pm 4,72\%$. Реже *H. pylori* выделяли у больных, получивших курс лечения — прооперированных ($32,43 \pm 7,8\%$), у пациентов, получивших лечение по схеме А (7-ми дневной курс тройной эрадикационной терапии: кларитромицин (500мг 2 р/сут), Амоксицилин (1000мг 2 р/сут) и омепразол (20мг р/сут)) — $35,29 \pm 7,8\%$ и по схеме В (14-ти дневной прием 150мл минерализованной сульфидной воды 3 р/сут) - ($35,29 \pm 7,8\%$). (См. рис.2.).

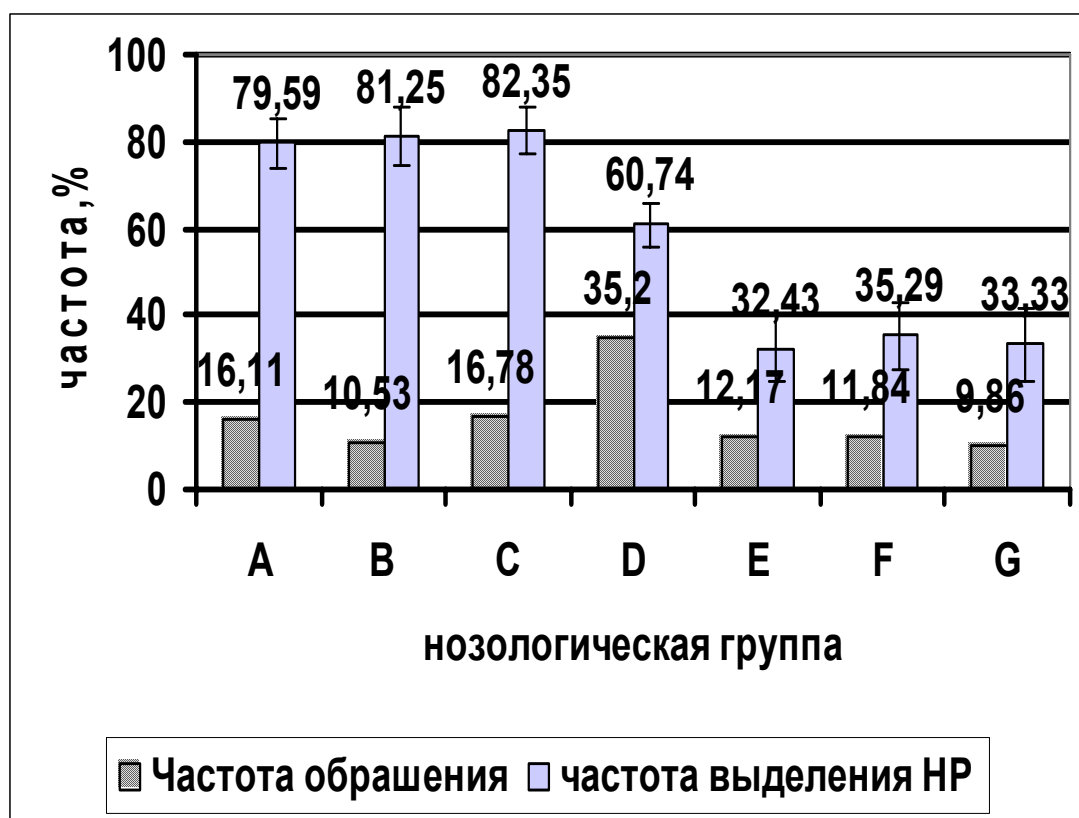


Рисунок 2. Частота выделения *H. pylori* в зависимости от диагноза.

А-рак желудка, В -ЯБЖ, С-ЯБДПК, D-гастрит, Е-после операции, F- пациенты, получившие лечение по схеме А, G- пациенты, получившие лечение по схеме В

Выявлена корреляция между степенью обсемененности и тяжести заболевания. У 49 больных со злокачественными опухолями в $61,22 \pm 6,9\%$ случаев выявляли высокую степень обсемененности (10^4 - 10^5 КОЕ/биоптат). У больных язвенной болезнью желудка высокую обсемененность обнаружили у $46,87 \pm 8,8\%$, среди страдающих язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки у $43,14 \pm 6,9\%$ и среди больных гастритом — у $24,30 \pm 4,1\%$ пациентов. Полученные данные указывают на наличие прямой связи между тяжестью патологического процесса, частотой выделения *H. pylori* и степенью обсемененности бактериями.

Известно, что одним из признаков вирулентных штаммов микроорганизмов является высокая скорость размножения в организме-хозяине, о чем свидетельствует наличие множества юных клеток в популяции. В их цитоплазме накапливается большое количество

рибонуклеотидов, обуславливающих высокую базофилию клеток и способность к выраженной адсорбции анилиновых красителей. Этот феномен связывают с большей активностью дыхательных ферментов у вирулентных штаммов (Григорьева и соавт., 1992).

Проведенные нами исследования способности выделенных штаммов бактерий адсорбировать краситель Романовского-Гимзы показали, что их вирулентность коррелировала со степенью тяжести патологий. Среди изолятов, выделенных от больных раком желудка, 100% штаммов оказались вирулентными. Из них 17 ($43,59 \pm 7,9\%$) обладали высокой степенью вирулентности. У больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки до $87,5 \pm 6,4\%$ выделенных изолятов были вирулентными. При этом, около 40% проявляли высокую вирулентность. От больных гастритом было выделено $70,8 \pm 5,6\%$ вирулентных изолятов, из них $54,35 \pm 2,3\%$ обладали низкой степенью вирулентности.

К числу важных факторов патогенности *H. pylori* относят фимбриальные и афимбриальные адгезины (Ilver et al., 1998; Gerhard et al., 1999; Маев и соавт., 2000; Prinz et al., 2003). Известно, что способность колонизировать различные эпителии обусловлена их способностью к адгезии на чувствительных клетках. У большинства грамотрицательных бактерий способность прикрепляться к различным эпителиям обусловлена наличием фимбрий различных типов. Наиболее часто их различают по способности агглютинировать эритроциты. В частности, авирулентные штаммы патогенных бактерий несут только маннозочувствительные фимбрии. В отличие от них вирулентные штаммы способны к D-маннозозависимой агглютинации эритроцитов, что лежит в основе дифференцирования адгезинов (Каральник и соавт., 1990). Между пробой с включением анилиновых красителей и реакцией гемагглютинации в присутствии D-маннозы нами была обнаружена прямая, статистически достоверная связь ($P < 0,01$).

Наши исследования показали, что в зависимости от гистологического статуса патологического процесса от 60% до 84,61% изолятов *H. pylori* были способны к маннозозависимой агглютинации эритроцитов. Штаммы *H. pylori*, выделенные от больных раком желудка, язвенной болезни желудка и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, адгезировали достоверно чаще ($84,61 \pm 5,8\%$, $73,07 \pm 8,7\%$ и $73,80 \pm 6,8\%$), чем штаммы, выделенные у больных гастритом ($60,00 \pm 6,1\%$). Это является подтверждением того, что тяжесть язвенной патологии желудочно-кишечного тракта напрямую зависит от способности *H. pylori* прикрепляться к эпителию желудка.

Несмотря на большое количество исследований биологических свойств *H. pylori*, возможность длительного его сохранения остается проблематичной. Консервирование выделяемых штаммов бактерий имеет большое значение для ретроспективного изучения его биологических свойств (например, факторов патогенности, чувствительности к антибактериальным препаратам), для создания банка штаммов *H. pylori*, циркулирующих в определенных регионах и для обучающих целей. Существующие методы консервирования *H. pylori* включают лиофилизацию культур либо их глубокую заморозку, что требует наличия специального оборудования, часто недоступного для рядовых бактериологических лабораторий.

Мы изучили возможность длительного сохранения *H. pylori* в модифицированной нами среде. Аналогичная среда была предложена МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского для сохранения возбудителей коклюша и паракоклюша при -20°C . После хранения выделенных штаммов в модифицированной консервирующей смеси (сахарозо-желатиновая среда в буферно – физиологическом растворе) в течение 6 и 9 месяцев нами было рекультивировано 100% культур, после 12 месяцев — 90%. При сравнительном изучении частоты рекультивирования мы обнаружили снижение высеваемости культур *H. pylori* при хранении свыше 12 месяцев.

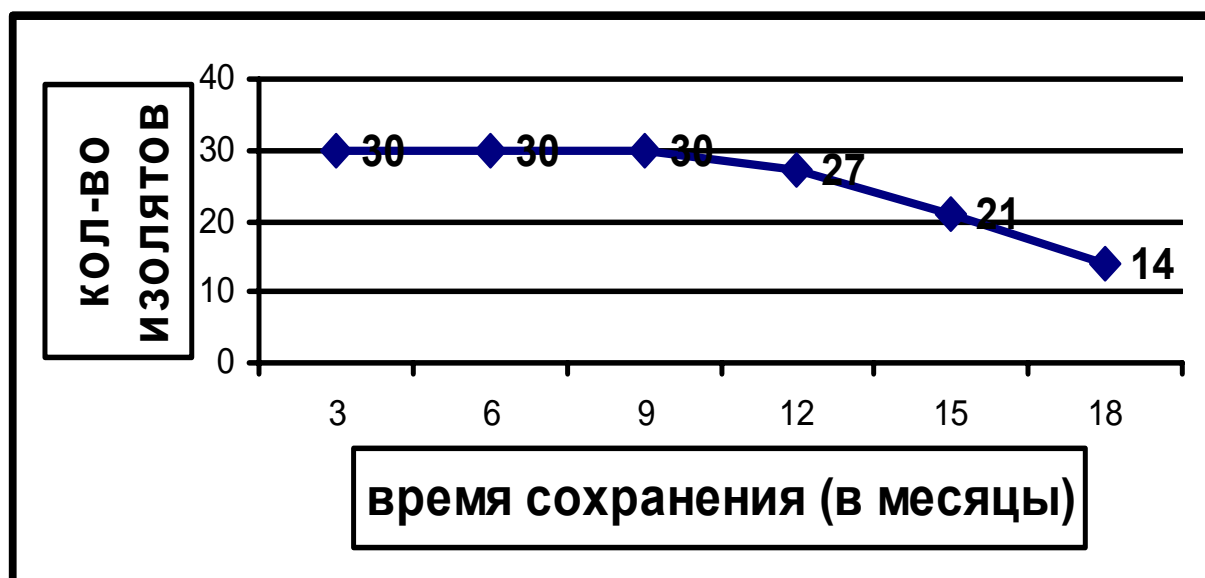


Рисунок 3. Частота рекультивирования *H. pylori* в зависимости от срока хранения в консервирующей смеси.

У 42 изолятов *H. pylori*, выделенных у больных гастродуоденитами, а также с язвенной патологией желудка и двенадцатиперстной кишки, был изучен спектр чувствительности к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом. Изученные штаммы были чувствительны к кларитромицину, амоксицилину и ципрофлоксацину соответственно в 85%, 79% и 90% случаев. Чувствительность к тетрациклину и эритромицину составляет около 65% и 60% соответственно. Наибольшую резистентность бактерии проявляли в отношении метронидазола (32%). Изученные штаммы были абсолютно устойчивыми (100%) к цефазолину, цефалотину и цефалексину.

При изучении свойств штаммов *H. pylori*, выделенных после применения антибактериальных препаратов, мы обнаружили следующие изменения: колонии отличали точечные размеры, в мазках-отпечатках преобладали инволюционные кокковидные палочки, ферментативная бактерий была активность снижена. Проба с анилиновыми красителями была отрицательной или слабоположительной, то есть колонии были образованы авирулентными и слабовирулентными штаммами. Таким образом, под воздействием антибактериальных препаратов произошли модификационные

изменения, способствующие длительному выживанию при неблагоприятных условиях.

Таким образом, вопросы эрадикации хеликобактеров остаются весьма актуальными для современной медицины. Предложенные схемы лечения быстро теряют эффективность, что обусловлено ростом резистентности *H. pylori* к антибактериальным препаратам.

Нами изучено влияние минерализованной сульфидной воды из санатория «Чувашия» на *H. pylori* in vitro. Были обследованы 22 биоптата, полученные от 22 пациентов. Установлено, что минерализованная сульфидная вода из санатория «Чувашия» снижает подвижность *H. pylori* in vitro, угнетает рост и снижает уреазную активность бактерий. В опытах при экспозиции материала в течение 30 мин в сульфидной минерализованной воде частота выделения *H. pylori* составляет 27,3% при концентрации H_2S 25 и 10 мг/л. При концентрации H_2S 2,5 мг/л частота выделения *H. pylori* составляет 45,5 %. Однако после 60 мин выдержки материала, частота выделения *H. pylori* составила 22,7% при концентрации H_2S 25 мг/л; 27,3% при концентрации H_2S 10 мг/л и 36,4 % при концентрации H_2S 2,5 мг/л по сравнению с контролем (72,72%).

Антихеликобактерный эффект минерализованной сульфидной воды вероятно связан с тем, что H_2S нейтрализует «защитное аммиачное поле», образующееся вокруг бактерии. Сероводород, являясь слабой кислотой, отдает ион водорода; аммиак, являясь слабым основанием, принимает ион. Протолитическая теория Лоури рассматривает такую реакцию как нейтрализацию протона кислоты основанием. Сероводород при недостатке кислорода окисляется до серы, последняя, имея незавершенный внешний энергетический уровень, может присоединять два электрона и проявлять свойства окислителя. H_2S инактивирует ферменты тканевого дыхания хеликобактерий, а как сильный восстановитель вызывает блокаду фермента уреазы.

По данным С.Д. Каратаева (2001) при внутривенном введении

озонированного физиологического раствора на фоне противоязвенной терапии эрадикация *H. pylori* было 40-60% и количество рецидивов в течение 3 лет после лечения с применением озона было значительно ниже, чем когда лечение проводилось по традиционной схеме. Установлено, что озон в терапевтических дозах действует как бактерицидное и анальгезирующее средство, а также улучшает метаболические и репаративные процессы (Перетягин и соавт., 2001).

Нами было изучено воздействие на культуральные и биохимические свойства *H. pylori* in vitro озонированной воды, концентрация озона в которой составила 5 мкг/мл. Установлено, что *H. pylori* теряет подвижность в присутствии озонированной воды. Мы определяли уреазную активность взвеси в Clo-test спустя 5, 10 и 20 минут выдерживания взвеси в пробирке с 1 мл озонированной воды. Уреазная активность снизилась до нуля через 20 мин культивирования. В опытах по определению влияния озонированной воды на рост *H. pylori* in vitro мы установили, что исследуемая вода угнетает рост бактерий. В опытных вариантах частота обнаружения составляет 27,3% после выдержки посевного материала 30 мин в озонированной воде, и 13,6% после выдержки 60 минут, в то время как частота роста колоний *H. pylori* в контроле составил 72,72 %.

Проведенные исследования позволяют заключить, что озонированная вода в концентрации 5 мкг/мл снижает жизнеспособность *H. pylori*, что выражается в ограничении их подвижности в эмульсии, подавлении уреазной активности и подавлении роста на твердых средах. Так как в подобной концентрации озонированная вода не токсична для макроорганизма, то ее применение имеет определенные перспективы.

Для ускоренной идентификации *H. pylori* мы модифицировали метод посева, предложенный A. J. Degnan и соавт. (2002) для выделения *H. pylori* из воды. Для этого мы использовали новую модифицированную нами среду ЭСАМ (эритрит-сывороточный агар с мочевиной). Наша среда отличается набором антибиотиков, внесенных для подавления роста сопутствующей

микрофлоры при посевах. После посева вокруг колонии *H. pylori* образовывались зоны красного цвета за счет щелочения среды, так как *H. pylori* выделяет уреазу, которая расщепляет мочевины до аммиака, и аммиак как щелочь изменяет цвет среды.

Нами также модифицирован экспресс тест для определения уреазной активности *H. pylori*, заменив один из его компонентов, а именно тетрациклин на другие антисептики, такие как фурацилин, раствор Люголя и хлорамин. Мы определяли динамику изменения pH предложенных нами тестов, а также их отдельных компонентов, сразу после их приготовления и после 24 часов. Значения pH существенно не изменились, что свидетельствует о надежности предложенных тестов и об исключении ошибок при их использовании. Результаты наших исследований позволили нам прийти к заключению, что в качестве замены тетрациклина лучше всего подходит фурацилин или 1% раствор Люголя.

Новые методы выделения и идентификации *H. pylori*, предложенные в работе, значительно облегчают культивирование и идентификацию бактерий, выделенных из клинического материала. Разработанная модификация уреазного теста отличается простотой проведения, доступностью и воспроизводимостью полученных результатов.

ВЫВОДЫ

1. Частота выделения *H. pylori* у обследованных пациентов (304 человека) с заболеваниями гастродуоденального тракта составила 39% у лиц в возрасте 24 года, 56% у пациентов в возрасте 25-44 года, 68% в возрастной группе 45-64 года и 79% у лиц в возрасте 65 лет и выше.
2. Обнаружение бактерий прямо зависит от тяжести заболевания: чаще их выделяли от больных раком желудка (80% случаев), язвенной болезнью желудка (81%), язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (82%) и гастритом (61%). Зависимости частоты обнаружения *H. pylori* от пола пациента не установлено.

3. Установлена корреляция между тяжестью патологии желудочно-кишечного тракта и вирулентными свойствами изолятов бактерий, а также уровнем обсемененности. При раках желудка 100% изолятов были вирулентными, при язвах желудка и двенадцатиперстной кишки — 88% штаммов. У этих пациентов уровни высокой обсемененности (10^4 - 10^5 КОЕ/биоптат) выявляли у 61% пациентов с онкологическими заболеваниями желудка, у 47% больных, страдающих язвами желудка и у 43% с язвами двенадцатиперстной кишки.
4. Выделенные изоляты были чувствительны к кларитромицину, амоксицилину и ципрофлоксацину (85%), тетрациклину (60%) и эритромицину (65%), фурацидолу (40%) и метронидазолу (32%). Все штаммы были абсолютно устойчивы к цефазолину, цефалотину и цефалексину.
5. Проведение антибактериальной терапии значительно снижает уровень обсемененности (до 10^2 - 10^3 КОЕ\ биоптат), приводит к нарушению морфологических и культурально-биохимических свойств, снижает скорость роста и вирулентность при рекультивировании.
6. Показана перспективность применения минеральной сульфидной (концентрация H_2S 25мг/мл) и озонированной (5 мкг озона/мл) воды в качестве альтернативного метода элиминации *H.pylori* либо включения в качестве дополнительного компонента в этиотропную терапию хеликобактериозов.
7. Разработан новый метод упрощенной идентификации *H. pylori*, включающий применение эритрит-сывороточного агара с мочевиной; модифицированного уреазного теста с 1% раствором Люголя и фурацилина.
8. Предложен метод длительного сохранения изолятов бактерий (до 12 месяцев) при температуре $-10^{\circ}C$ в модифицированной консервирующей смеси на основе сахарозо-желатиновой среды в буферно-физиологическом растворе.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Исаева Г.Ш. Сохранение и рекултивирование штаммов *Helicobacter pylori* / Г.Ш. Исаева, К. Муфер, О.К. Поздеев, О.Н. Ильинская // Материалы научной конференции « Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» Казань.- 2004.-С. 43-44.
2. Муфер К. Влияние озонированной воды на *Helicobacter pylori* in vitro/ К. Муфер, Э. Мукете, О.К. Поздеев, О.Н. Ильинская // Материалы XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» Казань.-2005.-С.66-67.
3. Исаева Г.Ш. Динамика морфологических изменений слизистой оболочки желудка у пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori*, под влиянием эрадикационной терапии / Г.Ш. Исаева, Л.Г. Морозова, О.К. Поздеев, Г.Н. Лапшина, К. Муфер // Окружающая среда и здоровье населения: сборник тезисов XI научно-практической конференции Поволжского региона. Казань.- 2004.-С. 22-25.
4. Муфер К. Проблема резистентности *H. pylori* к антибиотикам и поиск новых подходов к их элиминации при лечении язвенной патологии желудка и двенадцатиперстной кишки / К. Муфер, О.К. Поздеев // «Человек и окружающая среда» Информационный бюллетень № 3-4 (89-90).- Казань.- Март-Апрель 2006г.-С. 28-33.
5. Исаева Г.Ш. Чувствительность клинических изолятов *Helicobacter pylori* к антибактериальным препаратам / Г.Ш.Исаева, К. Муфер, О.К.Поздеев // Клиническая микробиология и Антимикробная химиотерапия.- 2005г. -Том 7.-№2. Приложение 1.-С.30-31.
6. Исаева Г.Ш. Возможность длительного сохранения изолятов *Helicobacter pylori* / Г.Ш.Исаева, К. Муфер, О.К.Поздеев // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. Внеочередной выпуск 1- 2004г.-С.58-60.
7. Муфер К. Влияние озонированной воды и сульфидной минерализованной воды из источника санатория «Чувашия» на

- культуральные свойства *Helicobacter pylori* in vitro/ К. Муфер, Э. Мукете, О.К. Поздеев, М.Ф. Самигуллин // Материалы XIII научно-практической конференции Поволжского региона « Окружающая среда и здоровье населения» Казань.- 2005.-С. 23-26.
8. Муфер К. Определение антибиотикограмм изолятов *Helicobacter pylori*, выделенных у больных с язвенной патологией желудка / К. Муфер, Э. Мукете, О.К. Поздеев, Г.Ш. Исаева // Материалы XIII научно-практической конференции Поволжского региона « Окружающая среда и здоровье населения» Казань.- 2005.-С. 26-28.
9. Исаева Г.Ш. Идентификация бактерий у *Helicobacter pylori*-негативных больных В-клеточной лимфомой желудка / Г.Ш. Исаева, К. Муфер, О.К. Поздеев, Ф. Лерус // Материалы международного симпозиума «Научные основы обеспечения защиты животных от экзотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний». Казань, 2005г.-С.181-185.
- 10.Патент. Морозова Л.Г. Метод выделения культур *H. pylori* / Исаева Г.Ш., Морозова Л.Г., Поздеев О.К., Лапшина Г.Н., Муфер К.// Патент № 2004123018 Российское агентство по патентам и товарным знакам.
- 11.Приоритетная справка. Самигуллин М.Ф., Симунов Ю.Л., Муфер К., Добрыващин С.В., Якупов Р.Р. Способ лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Приоритетная справка по заявке №2005115983 выдана федеральным институтом промышленной собственности 26 Мая 2005г.
- 12.Приоритетная справка. Исаева Г.Ш., Муфер К., Поздеев О.К., Мукете Э. Дифференциальная диагностическая среда для выделения *H. pylori*. Приоритетная справка по заявке №2006137093 выдана федеральным институтом промышленной собственности 19 Октября 2006г.